动 物 学 研 究 2001, Apr. 22 (2): 110~114 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

神经激肽B受体在小鼠消化道内的定位

王 红[①] 张远强[①] 丁玉强[②]
(第四军医大学 ①基础部组织学与胚胎学教研室; ②神经科学研究所 西安 710032 hwang@21cn.com)

摘要: 采用免疫组织化学ABC染色方法研究了神经激肽B受体(NK3r)在小鼠消化道的分布。NK3r样阳性的神经元胞体及神经纤维主要分布在十二指肠、空肠、回肠及结肠的粘膜下层神经丛和肌间神经丛,NK3r样阳性产物在食管、胃和直肠的神经丛中未见分布;NK3r样阳性产物大部分局限于神经细胞表面,也存在于胞质和一些轴突内部,并在胞质中较细胞表面染色浅。统计结果表明NK3r样免疫阳性神经元占肠神经系统神经元总数的0.5%~1%。提示小鼠消化道内NK3r样阳性神经元可能参与消化功能的调节。

关键词: 神经激肽B受体; 小鼠; 免疫组织化学; 消化道
中图分类号: Q954.52 **文献标识码**: A **文章编号**: 0254-5853(2001)02-0110-05

速激肽家族[包括P物质、K物质(神经激肽A)和神经激肽B(NKB)]及其受体(NK1、NK2、NK3受体)在神经系统的功能活动中起重要作用。Ding *et al*. (1996)就NK3受体在大鼠中枢神经系统分布及其在机体水盐代谢和渗透压调节中的作用等方面做过一些研究。Portbury *et al*. (1996a)的研究表明速激肽存在于小肠肠壁内神经元,并参与一系列消化道功能的调控;药理学研究还证实NK3r位于神经元而不是肌细胞(Maggi *et al*., 1993; Bertrand & Galligan, 1994);受体定位研究结果也证实大鼠和豚鼠NK2r位于肌细胞和肠肌间神经节中间神经元末梢(Grady *et al*., 1996; Portbury *et al*., 1996a),而NK1r样阳性产物仅存在于神经元和Cajal细胞(Portbury *et al*., 1996b; Vigna *et al*., 1994; Sternini *et al*., 1995)。Mann *et al*. (1997)和Grady *et al*. (1996)报道了大鼠肠肌间神经丛内有NK3r样阳性神经元,且与NK1r共存。虽然这些研究结果均提示速激肽受体存在于小鼠消化道内,其作用除影响血压、增强血管通透性以外,还可能与肠肌的收缩与舒张有关,但是迄今为止未见国内外有神经激肽B受体在小鼠消化道内定位的报道。本研究旨在前期研究的基础上对小鼠消化道内NK3r受体的分布做进一步研究。

1 材料和方法

1.1 材料

雄性昆明小鼠10只,25~30 g,其中8只以颈椎脱臼法通过腹部正中切口暴露腹腔,暴露的消化道器官不断用温和的0.01 mol/L PBS (pH7.0)清洗以保持湿度。食道、十二指肠、空肠、回肠、盲肠和结肠取材后用含尼莫地平(10^{-6} mol/L)的0.01 mol/L PBS冲洗,以4%的多聚甲醛充盈后将各肠段两端扎紧,再放置其中固定6~8 h。胃的固定方法参照彭曦等(1999)的方法,固定8 h后将胃与各肠段剪开,以0.01 mol/L PBS冲洗再置于30%的蔗糖液中放置24 h (4℃过夜),0.01 mol/L PBS冲洗干净后每例小鼠肠段环形切开4~6 mm,在解剖镜下剥离出粘膜层和带肌间神经丛的纵肌层铺片。

1.2 染色步骤

铺片分2组,第1组NK3r受体免疫组织化学染色按ABC法进行,染色步骤如下:①放置在兔抗NK3受体抗体(Ding *et al*., 1996)(1:50)内,在室温下孵育过夜;②置生物素标记的羊抗兔IgG(Vector, 1:200)内,在室温下孵育4 h;③置ABC复合物(Vector, 1:200)内反应2 h。最后铺片在含0.05%

收稿日期: 2000-05-22; 修改稿收到日期: 2000-12-22
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.39600045、No.39970377, No.39870109)

的 DAB、0.003%的 H_2O_2 的 0.05% mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH7.6)内呈色 20～30 min。第 2 组铺片前两步同第 1 组的①②，然后置入得克萨斯红标记的 Avidin(Sigma，1∶1000)中，室温放置 1～3 h，余同上；然后裱于涂有明胶的载片上，脱水透明，DPX 封片。对照实验在正常兔血清代替一抗或省略一抗的情况下进行，结果为阴性。第 2 组铺片在 Olympus BX－60 荧光显微镜下进行暗视野观察。

在另外 2 只雄性昆明小鼠上取材，冰冻切片，各肠段置于含尼莫地平(10^{-6} mol/L)的0.01 mol/L PBS 中清洗，后置入 4%的多聚甲醛中固定并 4℃过夜，浸入 30%的蔗糖液中至第 2 天用 OCT 包埋，恒冷箱切片 10 μm，切片贴于明胶片上，室温凉干后进行免疫组织化学染色，染色过程同上。对照实验在用正常兔血清代替一抗或省略一抗的情况下进行，结果为阴性。进行明视野和暗视野观察的铺片在 Olympus 显微镜下观察神经元分布和特征，用显微镜目镜测微尺对各部分的免疫阳性神经元进行观察测量、计数并摄片。

2　结　果

消化道铺片和切片的免疫组织化学染色结果发现，NK3r 样阳性神经元胞体及神经纤维存在于空肠、回肠和结肠粘膜下神经丛和肌间神经丛(图 1：A～H)，肌间神经丛神经元染色强度高于粘膜下层神经丛；而食道、胃和直肠的神经丛呈 NK3r 样免疫反应阴性。在食道的平滑肌细胞中未发现有阳性产物。

NK3r 样阳性物质主要存在于神经细胞的细胞膜、细胞质，细胞核无着色；细胞膜表面的阳性产物的染色强度较细胞浆内深（图 1：A、B、F、H）。肠肌层肌间神经丛的神经元染色强度（图 1：A、C、D、F）略高于粘膜下层神经丛，NK3r 样阳性神经元胞体及阳性神经纤维呈网格状分布（图 1C），可见阳性神经元之间的阳性纤维呈串珠样连接（图 1G），纵行的神经纤维间有横行的节间束。肌间神经丛和粘膜下层神经丛中的阳性神经纤维均呈网格状分布，但以前者最为明显（图 1：B、C）。在恒冷箱切片中，NK3r 样免疫阳性产物位于小肠的肌间神经丛（图 1D）。

在 2 种神经丛的 NK3r 样阳性神经元中，神经元胞体形态呈 Dogiel Ⅱ型、圆形和卵圆形，有发散状串珠样突起结构；有的神经元胞体较大，有较多的突起自胞体发出，其中两三个突起较长，有分级结构。显微镜下的计数结果如表 1、表 2 所示。

表 1　小鼠消化道内 NK3r 样阳性神经元计数结果（平均数 ± 标准差）

Table 1　The number of NK3r immunoreactivity neurons cell bodies in mouse gastrointestinal tract (mean ± *SE*)

区域 (region)	神经元密度/细胞数·cm^{-2} (neuronal density/cells·cm^{-2})	
	肌间神经丛 (myenteric plexus)	粘膜下神经丛 (submucous plexus)
食管 (oesophagus)	－	－
胃 (stomach)	－	－
十二指肠 (duodenum)	82 ± 14	95 ± 12
空肠 (jejunum)	249 ± 37	237 ± 31
回肠 (ileum)	143 ± 24	140 ± 19
结肠 (colon)	118 ± 17	107 ± 15

以每片面积为 0.05 cm^2 的组织片为单位进行计数，± 示标准差；－示阴性（in each tissue preparation neurons in areas of 0.05 were counted and the frequencies were expressed as mean ± S.E.M.，－ almost no）。

表 2　小鼠消化道内 NK3r 样阳性神经元形态特点

Table 2　Morphological characteristics of NK3r stained neurons in the mouse gastrointestinal tract

	区域 (region)	细胞形态 (shapes)		大小 (cell soma diameter) /μm	
		单极或双极 (unipolar or bipolar)	多极 (multipolar)	最大值 (major)	最小值 (minor)
肌间神经丛 (myenteric plexus)	食管 (oesophagus)	－	+		
	胃 (stomach)	－	+		
	十二指肠 (duodenum)	+++	++++	17～38	10～26
	空肠 (jejunum)	+++	++++	25～46	13～20
	回肠 (ileum)	+++	++++	21～37	12～18
	结肠 (colon)	+-	+++	15～36	14～16
	盲肠 (rectum)	－	++	13～34	8～19
粘膜下神经丛 (submucous plexus)	胃 (stomach)	－	+		
	十二指肠 (duodenum)	+++	++++	16～35	8～11
	空肠 (jejunum)	+++	++++	19～42	10～13
	回肠 (ileum)	+++	++++	14～35	9～17
	结肠 (colon)	++	+++	13～27	8～15

－示阴性（almost no）；+ 示极稀少（very rare）；++ 示稀疏（infrequent）；+++ 示中等（common）；++++ 示致密（abundant）。

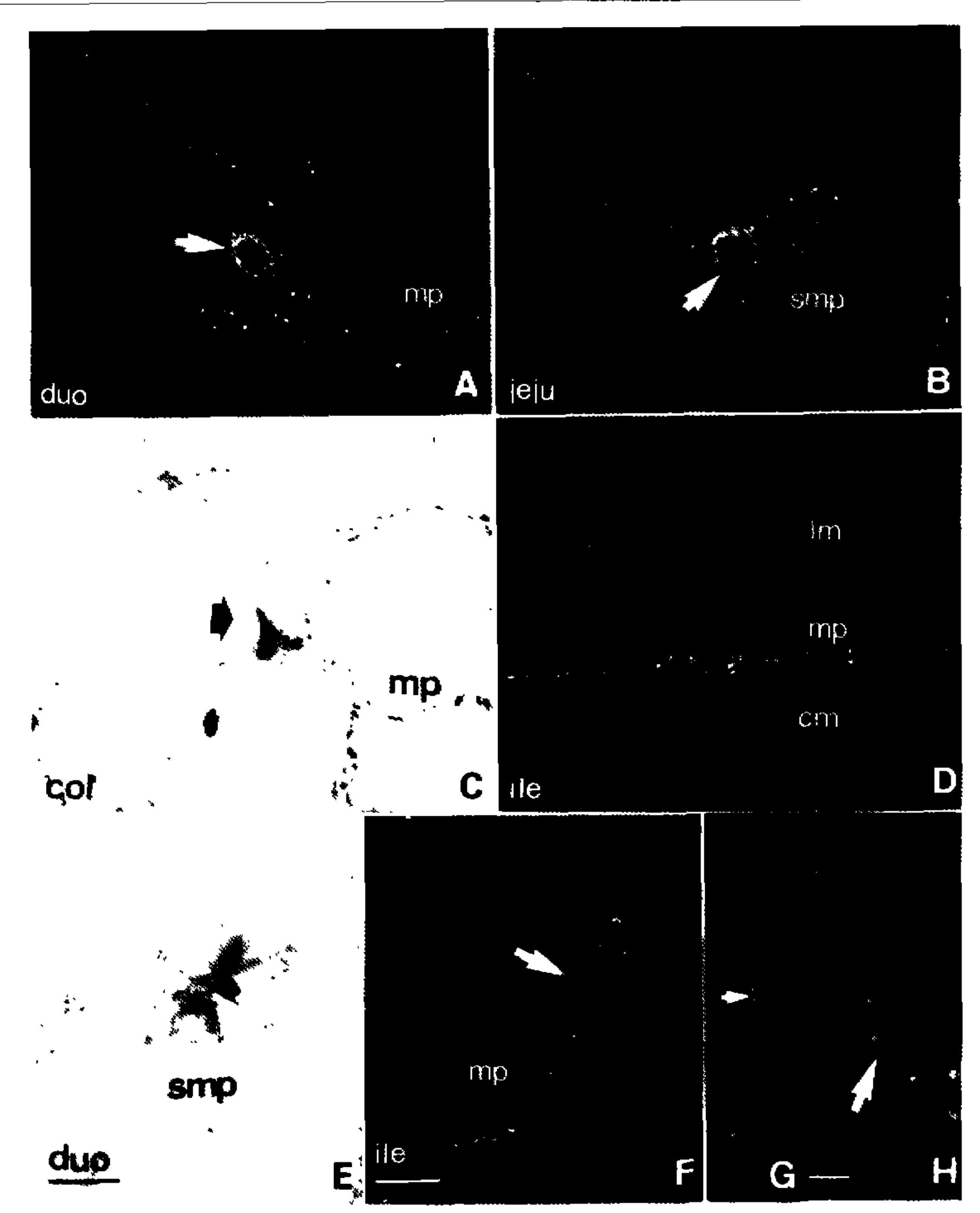


图1 神经肽B受体在小鼠消化道的定位

Fig.1 Immunohistochemical localizaion of neurokinin B receptor (NK3r) in the mouse gastrointestinal tract

A. 示小鼠十二指肠肠肌间神经丛中神经激肽B受体样阳性神经元(NK3r－Li),免疫阳性产物主要分布于细胞膜[showing the neurokinin B receptor immunureactivity (NK3r)-like (Li) neurons in the myenteric nerve plexus of duodenum. Immunoreactivity product mainly located on the cell membrane];

B. 示小鼠空肠粘膜下神经丛NK3r样阳性神经元(showing the NK3r-Li neurons in the snbmucosa neural plexus of jejnnum);

C. 示肠肌间神经丛结肠中NK3r样阳性神经元(showing the NK3r-Li mainly on the cell membrane in the colon's myenteric plexus);

D. 示在小鼠回肠切片肠肌间神经丛中NK3r样阳性神经元和纤维(showing the NK3r-Li neurons in the myenteric nerve plexus of ileum);

E. 示十二指肠粘膜下神经丛的NK3r样阳性神经元[(showing the NK3r-Li neurons in the submucosa nerve plexus of duodenum)。标尺示20 μm,同A-D (bar = 20 μm in Fig.A-E)];

F. 示回肠肠肌间神经丛中神经节的 NK3r 样阳性神经元(showing NK3r-Li neurons in the neuron ganglion of ileum myenteric nerve plexus)。标尺示 40 μm (bar = 40 μm)；

G. 示小肠肌间神经丛串珠样 NK3r 样阳性神经纤维(showing the NK3r-Li nerve fibers like necklace)；

H. 示小肠肌间神经丛中 NK3r 样阳性神经元的放大镜像(showing the higher magnification of Dogiel Ⅱ type NK3r-Li neurons)。标尺示 6 μm，同图 G(Bar = 6 μm in Fig. G, H)；

箭头示 NK3r 样阳性神经元(arrow presents the positive neuron)；mp：肌间神经丛(mp represents myenteric plexus)；duo：十二指肠(duo represents duodenum)；smp：粘膜下神经丛(smp represents submucosa nerve plexus)；jeju：空肠(jeju presents jejunum.)；col：结肠(col represents colon)；ile：回肠(ile represents ileum)；lm：纵肌(lm represents longitudinal muscles)；cm：环肌(cm represents circular muscles)。

3 讨　论

对神经激肽 B 受体（NK3r）在哺乳动物消化道内的分布，已有研究证实在豚鼠和大鼠的肠道神经系统内存在 NK3r 样阳性神经元(Grady *et al*.，1996；Mann *et al*.，1997)。本研究详细观察了 NK3r 受体在小鼠胃肠道内的分布，结果基本支持 Mann *et al*.（1997）和 Grady *et al*.（1996）的研究结果，但是有 3 点不同：①免疫阳性产物主要存在肠神经系统的神经元，在小鼠食管和其他部位的平滑肌中未发现阳性产物，这点与 Mann *et al*.（1997）的 NK3r 存在于大鼠食管和胃的平滑肌细胞的发现不同，与有关的药理学研究也不一致(Maggi *et al*.，1993；Guard & Watson，1991)。②在小鼠空肠、回肠神经丛内 NK3r 样阳性神经元形态特征有所不同，空肠粘膜下神经丛较回肠发达，神经元数量多，而回肠肌间神经丛中 NK3r 样阳性神经元多为 Dogiel Ⅱ型神经元，这点与在其他种属局限于回肠的研究不同。③免疫阳性产物主要存在肠神经系统的神经元细胞膜上，但有些阳性神经元胞质内也有免疫阳性产物。其细胞形态与 Mann *et al*.（1997）观察到的阳性神经元类似。除此以外，我们还发现有体积较小，突起特点不明显的阳性神经元，推测它们分别属于不同功能类别的肠神经系统神经元或存在种属差异。除周围神经系统外，本实验结果也支持关于 NK_3 在中枢神经系统的有关论点。Carpentier & Baude（1996）的结果表明，中枢神经系统迷走神经背侧复合体、迷走神经背核的 NK3r 样阳性神经元可能参与低位消化道迷走神经传入纤维的信息整合；从胃肠等低位消化道来的迷走神经传入纤维终止于迷走神经背侧复合体内侧亚核、孤束核（NTS）胶状质层，主要接受来自食管的传入神经纤维的 NTS 中央亚核却无 NK3r 样阳性神经元出现，因此，实验结果不但对以上观点以印证，还说明神经激肽 B 可能位于迷走神经传出神经元，它及其受体可能影响传出功能，继而影响胃肠道收缩和舒张。值得提出的是，肠道中两种神经丛的神经元计数结果表明，NK3r 样阳性神经元所占比例少于 1%，原因之一可能因为抗体是针对大鼠 NK3r 受体 C－末端，而此受体在小鼠存在差异。另一方面，虽然在啮齿类脑中的 NK3r mRNA 原位杂交结果与免疫组化结果一致，但 Tsuchida *et al*.（1990）研究表明，NK3r 受体 mRNA 在大鼠胃、小肠呈低水平表达，其原因可能与免疫阳性产物主要在细胞膜，胞浆中蛋白含量较低或 NK3r 受体在神经元上有不同的具体功能有关，也不能完全排除非特异性产物的可能性。

根据本实验观察到的 NK3r 样阳性神经元形态与 DogielⅡ型较为相符，且神经元数量较少，远远低于肠神经系统中 NK1r 样阳性神经元的比例。结合 NK3r 样阳性神经元大小、形态特点和药理学研究结果，推测在小鼠肠神经系统中 NK3r 样阳性神经元可能是与肠道收缩和舒张功能部分有关的传入中间神经元，与副交感神经纤维的功能密切相关。这是依照较认可的 Furness *et al*.（1994）对豚鼠肠神经系统中神经元的分类方法判断的，有待于进行功能性实验加以证实。

有关功能性实验提示 NK3r 的功能与消化道蠕动和胃肠内分泌有关。NKB、Senktide 等几种受体激动剂均刺激大鼠十二指肠和豚鼠回肠的收缩(Guard & Watson，1987)；在豚鼠回肠用河豚毒素可消除收缩反应和用阿托品降低收缩反应的事实，提示此受体位于肠肌间神经丛胆碱神经元（Guard & Watson，1987）；另外，Senktide 可刺激神经丛释放乙酰胆碱(Guard & Watson，1991)。Barthó *et al*.（1999）还证实 NK3r 存在于啮齿类消化道壁内神经元中，且调节速激肽引起的肠神经系统神经元兴奋，从而参与并影响收缩功能。本研究则进一步证明 NK3r 存在于啮齿类消化道壁内的神经元细胞膜，这些神经元可能是肠神经系统中部分内源性感觉神经元或传入中间神经元，说明速激肽类神经递质除通过神经元终末释放来影响肌细胞的功能外，还可

能通过影响神经元细胞膜上受体，并与其共同参与了肠道的收缩、舒张甚至内分泌功能。

综上所述，本研究不但详细观察了NK3r样阳性神经元及纤维在小鼠胃肠道内的分布情况，还为进一步确定胃肠道内NK3r样阳性神经元的功能奠定了基础。

参考文献

Bartho L, Lénárd J R L, Patacchini R, 1999. Tachykinin receptors are involved in the "local efferent" motor response to capsaicin in the guinea-pig small intestine and oesophagus[J]. *Neuroscience*, **90**: 221-228.

Bertrand P P, Galligan J J, 1994. Tachykinin- and synaptically-activated chloride current in myenteric neurons of guinea-pig ileum[J]. *J. Physiol.* (*Lond*), **481**: 47-60.

Carpentier C, Baude A, 1996. Immunocytochemical localization of NK3 receptors in the dorsal vagal complex of rat[J]. *Brain Research*, **734**: 327-331.

Ding Y Q, Shigemoto R, Takada M *et al*, 1996. Localization of the neuromedin K receptor (NK3) in the central nervous system of the rat [J]. *J. Comp Neurol.*, **364**: 290-310.

Furness J B, Bornstein J C, Pompolo S *et al*, 1994. The circuitry of the enteric nervous system[J]. *Neurogastroenterol. Mot.*, **6**: 241-253

Grady E F, Baluk P, Böhm S *et al*, 1996. Characterization of antisera specific to NK1, NK2, NK3 neurokinin receptors and their utilization to localize receptors in the rat gastrointestinal tract[J]. *J. Neurosci.*, **16**: 6975-6986.

Guard S, Watson S P, 1987. Evidence for NK3 receptor-mediated tachykinin release in the guinea-pig ileum[J]. *Eur. J. Pharmac.*, **144**: 409-412

Guard S, Watson S P, 1991. Tachykinin receptor types: classification and membrane signaling mechanisms[J]. *Neurochem. Int.*, **18**: 149-165.

Maggi C A, Patacchini R, Rovero P *et al*, 1993. Tachykinin receptors and tachykinin receptor antagonists[J]. *J. Auton Pharmacol*, **13**: 23-93.

Mann P T, Southwell B R, Ding Y Q *et al*, 1997. Localization of neurokinin 3(NK3) receptor immunoreactivity in the rat gastrointestinal tract[J]. *Cell Tissue Res.*, **289**(1): 1-9.

Peng X, Feng J B, Wang S L, 1999. Methods of showing rats stomach myenteric neural plexus[J]. *Anatomy Magazine*, **22**: 368-369. [彭曦，冯晋斌，汪仕良，1999. 显示大鼠胃肌间神经丛的铺片方法. 解剖学杂志，**22**: 368-369.]

Portbury A L, Furness J B, Southwell B R *et al*, 1996a. Distribution of neurokinin-2 receptors in the guinea-pig gastrointestinal tract[J]. *Cell Tissue Res.*, **286**: 281-292.

Portbury A L, Furness J B, Young H M *et al*, 1996b. Localization of NK1 receptor immunoreactivity to neurons and interstitial cells of the guinea-pig gastrointestinal tract[J]. *J. Comp. Neurol.*, **367**: 342-351

Sternini C, Su D, Gamp P D *et al*, 1995. Cellular sites of expression of the neurokinin-1 receptor in the rat gastrointestinal tract[J]. *J. Comp. Neurol.*, **358**: 531-540.

Tsuchida K, Shigemoto R, Yokota Y *et al*, 1990. Tissue distribution and quantitation of the mRNAs for three rat tachykinin receptors[J]. *Eur. J. Biochem.*, **193**: 751-757.

Vigna S R, Bowden J J, McDonald D M *et al*, 1994. Characterization of antibodies to the rat substance P(NK1) receptor and to a chimeric substance P receptor expressed in mammalian cells[J]. *J. Neurosci.*, **14**: 834-845.

Immunohistochemical Localization of Neurokinin B Receptor (NK3r) in the Mouse Gastrointestinal Tract

WANG Hong[1] ZHANG Yuan-Qiang[1] DING Yu-Qiang[2]

([1] *Department of Histology and Embryology*; [2] *Institute of Neurosciences, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China hwan@21cn.com*)

Abstract: To observe the localization of neurokinin receptor (NK3r) in the mouse gastrointestinal tract. Immunohistochemistry and immunoreactive fluorescence were used in the experiment. Our results showed that there aren't NK3r-like (-Li) positive materials on the smooth muscle cells of oesophagus, stomach, and intestine and other region's muscularis. The nerve cell bodies with immunoreactivity for NK3r mainly distributed in the submucous nerve plexus or myenteric nerve plexus of gastrointestinal tract except oesophagus and stomach and rectum. The reaction production was distributed on the nerve cell surfaces. Occasionally was observed in the cell plasma, but was very weak stained. Immunoreactive nerve cells' morphology was mostly like type of Dogiel Ⅱ. This research work not only described the distribution of neuronkinin B receptor in the mouse gut in detail, but also provided a morphological basis for deducing the functional identity of NK3r-immunoreactivity nerve cells in the gut.

Key words: Neurokinin B receptor; Mouse; Immunohistochemistry; Grastrointestinal tract